

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00302

伪柔弱拟菱形藻复合群的形态分类学研究

李 扬¹ 何利娜¹ 马艳艳¹ 吕颂辉^{1,2}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631; 2. 暨南大学理工学院, 赤潮与水环境研究中心, 广州 510632)

摘要: 于2007年夏季(8月)在广东省大亚湾海域观察到伪柔弱拟菱形藻复合群的6个种类: 花形拟菱形藻(*P. caciantha* Lundholm, Moestrup & Hasle)、靓纹拟菱形藻(*P. calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle)、尖细拟菱形藻(*P. cuspidata* (Hasle) Lundholm, Moestrup & Hasle)、曼氏拟菱形藻(*P. mannii* Amato & Montresor)、伪柔弱拟菱形藻(*P. pseudodelicatissima* (Hasle) Lundholm, Hasle & Moestrup)和中华拟菱形藻(*P. sinica* Qi & Wang), 其中花形拟菱形藻、靓纹拟菱形藻和曼氏拟菱形藻为我国新记录种类。对该复合群种类的形态学特征、生活习性和生态分布进行了观察和描述, 并对其种类之间的形态学特征进行了比较研究。

关键词: 伪柔弱拟菱形藻复合群; 形态学特征; 新记录种类; 大亚湾

中图分类号: Q94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0302-10

拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia*)是一类常见的海洋浮游硅藻种类, 广泛分布在全球各个海域。自1987年在加拿大的爱德华王子岛发生一起由于食用当地海域养殖的贻贝(*Mytilus edulis*)而引发的中毒事件, 造成3人死亡, 100多人中毒之后, 人们认识到硅藻种类也可以产生毒素, 拟菱形藻种类也由此得到人们的广泛关注, 并成为研究热点^[1-5]。拟菱形藻在属水平的鉴定工作于光学显微镜下就可以相对容易地完成, 但种间的鉴定就比较困难, 需要利用电子显微镜对其多个形态学特征进行详细观察^[6]。自20世纪90年代至今, 各国学者针对拟菱形藻属的分类学开展了诸多富有成效的工作, 拟菱形藻属的种类组成快速增加。目前, 国际上报道的拟菱形藻种类已达40余种, 仅在2007年, 就有10余个新种被报道, 其中一些种类的形态学区别特征极其细微, 伪柔弱拟菱形藻复合群(*Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex)的种类就是其中的典型代表^[7]。

在最初的研究中, 国内外学者均把点条纹由单排孔纹组成的拟菱形藻种类都鉴定成伪柔弱拟菱形

藻, 由于该种能够产生多莫酸毒素(Domoic acid)而备受各国学者们的重视, 并围绕该种进行了多领域的研究。有学者曾对分布于我国部分海域的拟菱形藻种群进行了分类学和生态学研究, 认为“伪柔弱拟菱形藻”广泛分布于我国沿海海域, 是浮游植物的重要组成部分, 并且在局部海域有多次暴发形成赤潮的记录^[4, 8-12]。近几年来, 有学者利用TEM和分子标记技术对不同海域的多个“伪柔弱拟菱形藻”株系进行了分类学专题的研究, 发现了一些形态学特征和DNA序列上的细微差别, 并以此为依据报道了若干新种^[7, 13, 23]。鉴于该复合群分类学研究的最新进展, 有必要对我国以往的分类学研究结果进行必要的补充和修订, 以确认在我国沿海多个海域广泛分布的拟菱形藻种类是真正的伪柔弱拟菱形藻, 还是伪柔弱拟菱形藻复合群中的其他相似种类。

大亚湾位于珠江口北侧, 面积约600 km², 是一个半封闭海湾。湾内生物资源丰富, 生物类型众多, 属亚热带海湾兼有热带特色, 它是广东省重要的水产养殖生产基地。以往研究认为“伪柔弱拟菱形藻”

收稿日期: 2008-10-09; 修订日期: 2009-09-25

基金项目: 国家自然科学基金(30700046); 广东省自然科学基金(7300190)资助

作者简介: 李扬(1978—), 男, 河南信阳人; 副研究员, 博士; 主要从事藻类分类学和生态学研究。E-mail: liyang@scau.edu.cn

通讯作者: 吕颂辉, E-mail: lusonghui1963@163.com

是该海域夏季浮游植物的优势种类, 并有多次暴形成赤潮的记录^[4, 9, 10]。因此, 本文选择大亚湾作为研究海域, 于 2007 年夏季(8 月)采集该海域的浮游植物样品, 针对其中的“伪柔弱拟菱形藻复合群”开展分类学研究。以期澄清该海域“伪柔弱拟菱形藻复合群”的种类组成, 明确拟菱形藻优势种及赤潮种, 继而为相关的深入研究奠定生物学基础, 并为我国其他海域的同类工作提供参考资料和基础数据。

1 材料与方法

于 2007 年夏季(8 月), 分别利用小体积采水器(2 L)和浮游植物拖网(孔径 10 μm)在大亚湾若干站位采集浮游植物样品, 站位设计(图 1)。采集的水样现场用鲁格氏液固定。带回实验室后, 采用静置沉淀浓缩的方法将水样浓缩至适宜的体积。取部分浓缩后样品, 并经过一系列处理步骤使之成为电镜样品: 首先是加入等量浓硫酸, 并在水浴中煮沸 15—20min, 然后用蒸馏水多次水洗至中性。

光镜观察: 吸取 0.1 mL 的浓缩水样, 滴在 0.1 mL 浮游植物计数框中, 加盖盖玻片后在 Olympus BX61 光学显微镜下观察、计数和拍照。

透射电镜观察: 用微量进样器吸取一定体积酸化后的水样, 滴加在喷镀碳膜的铜网上, 自然晾干后, 即可在 JEM-1010 TEM 下观察和拍照。

目前, 伪柔弱拟菱形藻复合群种类的标本水样保存在华南师范大学生命科学学院赤潮实验室的标本陈列柜中, 样品编号为 200708DY 系列。

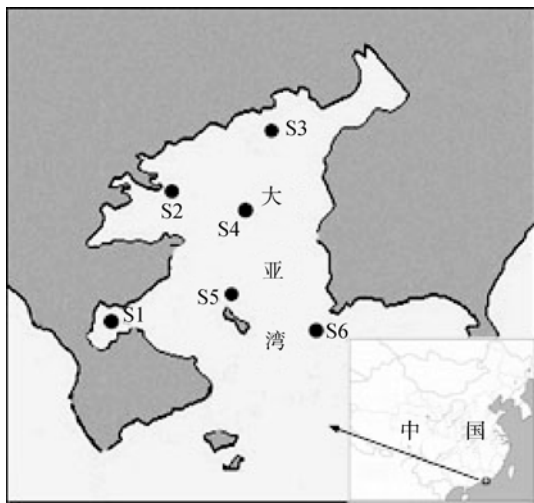


图 1 大亚湾站位示意图

Fig. 1 Sampling stations in Daya Bay

2 结 果

对采自大亚湾夏季(2007 年 8 月)的浮游植物样品进行光镜和透射电镜下的观察和拍照, 参考相关分类学资料, 鉴定到伪柔弱拟菱形藻复合群的 6 个种类: 花形拟菱形藻(*P. cactiantha* Lundholm, Moestrup & Hasle)、靓纹拟菱形藻(*P. calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle)、尖细拟菱形藻[*P. cuspidata* (Hasle) Lundholm, Moestrup & Hasle]、曼氏拟菱形藻(*P. mannii* Amato & Montresor)、伪柔弱拟菱形藻[*P. pseudodelicatissima* (Hasle) Lundholm, Hasle & Moestrup]和中华拟菱形藻(*P. sinica* Qi & Wang), 其中花形拟菱形藻、靓纹拟菱形藻和曼氏拟菱形藻为我国新记录的硅藻种类。

花形拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia cactiantha* Lundholm, Moestrup & Hasle (图版 1-1—6)

Lundholm, et al. 2003, p.806—807, fig.5, A-F.

可形成链状群体, 相邻细胞重叠部分约为壳面长度的 1/12—1/10(图版 1-1)。壳面披针形(图版 1-2、3), 壳面横轴处最宽, 从壳面横轴向两端逐渐变细; 两端钝圆, 略微不对称, 壳面一侧较直, 另一侧略微弯曲。壳面纵轴长 63—84 μm , 宽 2.6—3.3 μm 。管壳缝强烈偏心, 两个中央肋突之间的间隙较大, 即具有中央较大船骨点(图版 1-5)。壳面点条纹由一排孔纹组成, 孔纹近方形至圆形或卵圆形, 密度为 3—5 个/ μm 。每个孔纹的内部有 2—8 个小孔, 常见为 4—7 个, 规则分布在孔纹内部的四周, 小孔间隙有宽有窄, 绝大部分无中央小孔(图版 1-6), 偶见有。肋纹密度为 10 μm 内 28—31 条, 肋突分布规则, 密度为 10 μm 内 15—18 个。据以往研究报道^[13], 本种壳环带上肋纹密度为 10 μm 内 33—38 条, 每排点条纹有 2 列小孔组成, 点条纹的高度为 3—5 排小孔。本文未观察到环带结构。

本文标本与 Lundholm, et al. 描述的标本特征^[13]有一定的区别, 主要是孔纹内小孔的排列方式略有不同, Lundholm, et al. 描述的特征是: 孔纹内部有 4—5 个小孔, 主要分布在孔纹的上部和下部, 小孔间隙较大, 孔纹内部的大部分为无纹区; 而在本文标本中, 每个孔纹内部的小孔数目略多于 Lundholm, et al. 的记载, 数量一般为 3—8 个, 常见为 4—5 个, 较均匀的分布在孔纹的四周, 中部的无纹区相对较小。本文标本的其他形态学特征与 Lundholm, et al.

的记载一致, 所以我们将标本鉴定为花形拟菱形藻。孔纹内部结构的变化可能与细胞生活史的不同阶段有关, 也可能与细胞纯化培养的世代较长导致壳面特征变化有关。本文在自然海区样品中观察到 10 余个花形拟菱形藻的标本, 壳面的形态学特征稳定。

毒性: 以往研究均未检测到本种能够产生多莫酸毒素^[13]。

生态: 海水浮游生活。

分布: 标本采自大亚湾 S3 站位(8 月), 样品编号是 200708DY3, 细胞丰度达到 5.69×10^3 ind/L。本种首次记录于墨西哥 Tuxpam 湾, 以及泰国的安达曼海^[13]。

靓纹拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle (图版 I -7-12)

Lundholm, et al. 2003, p.801, figs 2A-G.

本种细胞可连接成链状群体, 相邻细胞重叠部分约为壳面长度的 $1/12-1/10$ ^[13], 本文未观察到群体。壳面为细长线形(图版 I -7), 环面观也为细长线形。壳面长 $56-78 \mu\text{m}$, 宽 $1.4-1.8 \mu\text{m}$ 。管壳缝强烈偏心, 中央处具有一个中央较大船骨点(图版 I -10)。肋突排列均匀, $10 \mu\text{m}$ 内 $15-19$ 个, 肋纹密度为 $10 \mu\text{m}$ 内 $35-39$ 条。点条纹由一排圆形或方形孔纹组成, 密度为 $4-6$ 个/ μm 。本种的典型性特征就是孔纹的内部结构呈花朵形: 每个孔纹内部被分成 $4-10$ 个小孔, 常见 $5-9$ 个小孔, 分布在孔纹的四周, 中央处多见一或两个小孔, 成梅花状或伞形(图版 I -10、11)。壳环带的点条纹由两列小孔组成, 高为 $4-5$ 排小孔(图版 I -12)。环带上孔纹的密度为 $10 \mu\text{m}$ 内 $42-48$ 条。

毒性: 曾有学者报道本种能够产生多莫酸毒素^[14, 15], 有些研究则显示为无毒^[16]。

生态: 海水浮游生活。

分布: 本种在大亚湾(8 月)各个站位均有分布, 最高细胞含量出现在 S6 站位, 达到 3.26×10^4 ind/L。本种分布广泛, 首次记录于丹麦(Ejby Harbour, the Isefjord, Sealand)^[17], 还曾记录于挪威、北大西洋水域、苏格兰、亚德里亚海^[18]、加拿大爱德华王子岛、美国佛罗里达 Tampa Bay、Apalache Bay、百慕大南部水域、智利、越南和澳大利亚悉尼附近水域^[13, 19]。

尖细拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia cuspidata* (Hasle) Lundholm, Moestrup & Hasle(图版 I -13-18)

Lundholm, et al. 2003, p.804-805, fig.3, A-G; 邢小丽等 2007, p.578, figs A-D.

Basionym: *Nitzschia cuspidata* Hasle 1965, p.1, pl.2, figs 6, 8, 9; 1974, p.435.

Synonym: *Pseudonitzschia* cf. *cuspidata* Priisholm, et al. 2002, in Diatom Research, 17(1): 158, figs 26, 27, 30-33, 36-39.

本种细胞可形成链状群体, 相邻细胞重叠部分约为壳面长度的 $1/3.5-1/5$ (图版 I -13)。壳面披针形, 壳面中央处最宽, 从中央处向两端逐渐变成尖细(图版 I -14、15)。壳面纵轴长 $50-98 \mu\text{m}$, 宽 $2.8-3.7 \mu\text{m}$ 。壳缝强烈偏心, 具中央较大船骨点(图版 I -17)。肋突分布均匀, 密度为 $10 \mu\text{m}$ 内 $15-23$ 个。肋纹的密度为 $10 \mu\text{m}$ 内 $31-41$ 条。点条纹由一排卵圆形或方形孔组成, $3-6$ 个/ μm 。孔内部被硅质“桥”分隔成 $2-4$ 个小孔, 绝大部分孔纹被分成上下两个半圆形小孔(图版 I -18)。壳环带上具有两排横向排列的点纹, 偶有 3 排的。

本种与伪柔弱拟菱形藻 *P. pseudodelicatissima* 很相似, 主要区别特征是: 本种壳面为披针形, 壳面自中部开始向两端呈现逐渐变尖变细的趋势; 伪柔弱拟菱形藻则为细长线形, 壳面大部是两侧几乎平行, 只是在壳端处才开始变窄。

毒性: Lundholm, et al. 曾分析了本种的 3 个地理株系(香港吐露港株、墨西哥图斯潘株系和 Canary 岛株系)的毒素含量, 均未检测到多莫酸^[13]。邢小丽等分析了分离自大亚湾海域的本种株系, 也未检测到多莫酸的存在^[20]。

生态: 海水浮游生活。

分布: 本文标本采自大亚湾(8 月)的 S2 和 S4, 样品编号是 200708DY2 和 200708DY4, 细胞含量在 10^2 ind/L 水平。邢小丽等曾报道于我国大亚湾海域(2005 年 11 月), 并分离获得该种的纯培养藻株^[20]。本种还曾记录于泰国、西班牙 Palmas、巴勒斯坦的迦南以及葡萄牙、香港、悉尼、墨西哥湾、西北非海域^[13]。

曼氏拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia mannii* Amato & Montresor (图版 II -19-24)

Amato & Montresor 2008, p.490, figs 1-5.

本种可形成多个细胞组成的链状群体, 相邻细胞重叠部分约为壳面长度的 $1/9-1/12$ ^[7], 本文只观

观察到单个生活的细胞, 未观察到群体形态。细胞的壳面观和环面观均呈细长线形(图版 II -19-21), 在比较靠近壳端的位置才开始逐渐变窄, 有性生殖过程中, 壳面两端可由渐尖形变为平截的钝圆形。壳面纵轴长 56—93 μm , 横轴宽 1.7—2.3 μm 。据 Amato & Montresor 报道^[7], 在培养条件下, 壳面纵轴的变化范围是 33—130 μm , 有性生殖过程中复大孢子萌发产生的第一代营养细胞的纵轴长度多在 120—130 μm 之间, 横轴为 1.7—2.6 μm 。壳面中央处的肋纹间隙较宽, 形成一个较大的中央船骨点(图版 II -24)。肋纹密度是 10 μm 内 32—36 条, 肋突的密度是 10 μm 内 14—19 条。每行点条纹由一排方形至圆形的孔纹组成, 孔纹密度为 4—6 个/ μm 。孔纹内部被分为 2—7 个六角形小孔, 常见 4—8 个小孔。Amato & Montresor 统计了 550 个孔纹, 认为只有 3.6% 左右的孔纹内部具有一个中央小孔纹^[7], 本文标本中的这一数据大约为 3.9%—10%(图版 II -24)。据 Amato & Montresor 报道^[7], 本种的壳环带由 3 条开放环带构成(其高度由环带中央向两端逐渐变窄), 壳环带的点条纹有两排孔纹组成, 每排点条纹的高度为 3—4 个孔纹。其他环带的孔纹也由两排孔纹组成, 但每排仅有 2 个孔纹。本文观察到的壳环带特征略有不同: 壳环带中部的高度为 4—5 排孔纹, 两端较窄, 高度为 3—4 排孔纹。

毒性: Amato & Montresor 曾分析了本种两个株系(均分离自意大利那不勒斯湾)培养液中多莫酸含量, 均未检测到^[7]。

生态: 海水浮游生活。

分布: 本文标本采自大亚湾(8 月)的 S2、S3 和 S4 站位, 样品编号是 200708DY2、200708DY3 和 200708DY4, 细胞含量较低。本种首次报道于意大利的那不勒斯湾^[7]。

伪柔弱拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Hasle) Lundholm, Hasle & Moestrup (图版 II -25—29)

Hasle 1996 p.131, fig.27, Fig.1, A-G; Lundholm, et al. 2003, p.801, figs 1A-G; Gao, et al. 2006.

Basionym: *Nitzschia pseudodelicatissima* Hasle 1965, p.1, 1976, p.101.

本种细胞可连接形成链状群体生活, 胞间连接部很短, 只在壳端位置, 相邻细胞重叠部分约为壳面长度的 1/8—1/11^[13], 本文未观察到群体。壳面呈细长线形(图版 II -25、26), 在靠近壳端处逐渐变窄,

两端对称。环面观为线形或披针形。壳长 53—84 μm , 宽 1.4—1.8 μm 。管壳缝强烈偏心, 具中央较大船骨点(图版 II -28)。肋突排列均匀, 10 μm 内 15—23 个, 肋纹密度为 10 μm 内 33—41 条。点条纹由一排圆形至方形的大孔纹组成, 孔纹密度为 5—6 个/ μm 。每个孔纹的内部被分为基本等大的两半, 被一条窄的硅质“桥”分割开(图版 II -29), 这一特征在 SEM 下常会被认为是两排孔纹。环带具一排大孔纹, 类似壳面孔纹。

毒性: Lundholm, et al. 曾分析了本种葡萄牙株系的毒素, 未检测到多莫酸^[13]。

生态: 海水浮游生活。

分布: 本种在大亚湾(8 月)各个站位均有分布, 最高细胞含量达到 7.21×10^4 ind/L, 出现在 S5 站位。Lundholm, et al. 的修订种标本采自丹麦海峡^[13], 葡萄牙和意大利那不勒斯湾也有记录。

中华拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia sinica* Qi & Wang (图版 II -30—32)

Qi & Wang 1994, p.90, plates 1—8.

本文只观察到本种的单个细胞, 未观察到群体类型, 以往研究也未曾记录本种有群体类型^[8]。本种的细胞壁硅质化程度重, 在透射电镜下的透光率弱, 因而颜色较深, 呈浓厚的黑色。壳面呈线形(图版 II -30), 纵轴长 86—104 μm , 横轴宽 3.7—4.2 μm 。大部分壳面的两侧几乎平行, 在壳端处骤然变窄, 形成钝圆形端部, 有些甚至会形成头状或嘴状末端(图版 II -31)。管壳缝偏心, 有中央较大船骨点(图版 II -32)。壳面上肋突密度为 10 μm 内 9—11 个, 肋纹密度为 10 μm 内 16—18 条。点条纹由一排方形至圆形的孔纹组成, 密度是 2—3 个/ μm , 孔纹内部或被分成 2—3 个小孔(图版 II -32)。本文未观察到环带结构。

毒性: 目前, 尚未见关于本种毒性的研究报道。

生态: 海洋浮游生活。

分布: 本文标本采自大亚湾(8 月)的 S1 和 S5 站位, 样品编号是 200708DY1 和 200708DY5, 细胞含量较低。本种首次发现于广东沿海的大鹏湾, 秋冬季较常见^[8]。

3 讨 论

3.1 伪柔弱拟菱形藻复合群的形态学特征

近年来, 形态学超微结构观察和有效分子标记

技术的共同应用,证实了硅藻中存在多个隐形种 (Cryptic species) 和拟隐形种 (Pseudo-cryptic species)^[7, 13, 21–25]。隐形种指形态学特征一致,但在遗传特征上有一定的差异;拟隐形种指除了遗传特征上的差异之外,形态学特征上也存在极其细微的差别,需要严格的形态学特征分析才能发现^[26]。伪柔弱拟菱形藻复合群的种类正是典型的拟隐形种类。在最初的研究中,各国学者将点条纹由单排孔纹组成的拟菱形藻种类都鉴定成伪柔弱拟菱形藻,由于该种能够产生多莫酸而备受各国学者们的重视,并围绕该种进行了诸多的工作。随着研究工作的深入,人们发现具有点条纹由单排孔纹组成特征的种类存在多种形态,并且有些株系可以产生多莫酸,有些株系则不能。于是,什么才是真正的伪柔弱拟菱形藻,成为首当其冲需要解决的问题。在透射电子显微镜(TEM)下,该复合群各种类之间的形态学区别虽然极其细微,但仍表现出很高的形态学特征的多样性。Lundholm, *et al.* 利用 TEM 和分子标记技术对采自不同海域的多个“伪柔弱拟菱形藻”株系进行了研究,发现它们之间在形态学特征上存在比较细微的区别,同时在 DNA 序列上也有一定的差别,并以此为依据,报道了两个新种:花形拟菱形藻和靓纹拟菱形藻,还重新修订了伪柔弱拟菱形藻和尖细拟菱形藻的分类学特征^[13]。Amato & Montresor 在此基础上,对 8 个分离自意大利那不勒斯湾的伪柔弱拟菱形藻株系进行了研究^[7],根据形态学和遗传特征上的细微差别,报道了一个新种:

曼氏拟菱形藻。再加上 Qi, *et al.* 报道的发现于中国南海大鹏湾海域的中华拟菱形藻^[8],目前伪柔弱拟菱形藻复合群的种类已经丰富到 6 个种类,该复合群种类的共同特征是:壳面点条纹由一排较大的方形或圆形—卵圆形孔纹构成,具有中央较大船骨点。它们与其他拟菱形藻种类在形态学特征方面的区别在电镜下较易区分,复合群内种间的区别特征则极其细微。

伪柔弱拟菱形藻复合群种类在 TEM 下的形态学特征较明显:① 线形或披针形的壳面外形;② 具有中央较大船骨点;③ 点条纹由单排孔纹构成;④ 相似的壳套和壳环带结构。尤其是单排孔纹这一特征,使该复合群种类区别于其他拟菱形藻种类。

3.2 伪柔弱拟菱形藻复合群种类之间的形态学差异

伪柔弱拟菱形藻复合群种类之间的主要区别特征是(表 1):① 壳面外形;② 孔纹内部小孔的数目及排列方式。首先在壳面外形上,靓纹拟菱形藻、曼氏拟菱形藻和伪柔弱拟菱形藻均为细长线形,壳面中部的两侧平行,只是在壳端处才骤然变窄;花形拟菱形藻和尖细拟菱形藻的壳面都是披针形,壳面中央处最宽,由此处向两端逐渐变窄;中华拟菱形藻壳面呈线形,但并非细长的线形,且壳面硅质化重,壳端常形成头状或嘴状结构。其次,壳面孔纹内部小孔的数目及其排列方式是该复合群种类之间区别的关键性依据。靓纹拟菱形藻、曼氏拟菱形藻和伪柔弱拟菱形藻的壳面外形相同,区别特征集中体现在孔纹的内部结构上。靓纹拟菱形藻和曼氏拟

表 1 伪柔弱拟菱形藻复合群种类之间的形态学区别
Tab. 1 Morphological features comparison among six species of *P. pseudodelicatissima* complex

特征 Features	<i>P. caciantha</i>	<i>P. calliantha</i>	<i>P. cuspidata</i>	<i>P. mannii</i>	<i>P. pseudo-delicatissima</i>	<i>P. sinica</i>
壳面外形 Valve shape	披针形 Lanceolate	细长线形 Linear	披针形 Lanceolate	细长线形 Linear	细长线形 Linear	线形 Linear
长度 Length (μm)	63—84	56—78	50—98	56—93	53—84	86—104
宽度 Width (μm)	2.6—3.3	1.4—1.8	2.8—3.7	1.7—2.3	1.4—1.8	3.7—4.2
肋纹密度 Striae (10 μm)	28—31	35—39	31—41	32—36	33—41	16—18
肋突密度 Fibulae (10 μm)	15—18	15—19	15—23	14—19	15—23	9—11
孔纹密度 Poroids (μm)	3—5	4—6	3—6	4—6	5—6	2—3
孔纹内结构 Arrangement within poroid	常见 4—7 个小孔,少见有中央小孔	常见 5—9 个小孔,多有中央小孔,梅花状	常见上下 2 个半圆形小孔	常见 4—8 个小孔,极少数有中央小孔	常见上下 2 个半圆形小孔	或有 2—3 个小孔
壳环带高度 Band width	3—5 排孔纹	4—5 排孔纹	2—3 排孔纹	3—4 排孔纹	2—3 排孔纹	—

菱形藻的形态学特征最为接近, 其壳面孔纹被若干条放射状排列的硅质“桥”分隔成 3—9 个小孔, 常见 4—8 个, 分布在孔纹的四周。但靓纹拟菱形藻约有一半左右的孔纹内部具有一个或两个中央小孔, 使整个孔纹成梅花状或伞形; 而曼氏拟菱形藻只有约 10% 以下的孔纹中具有一个或两个中央小孔, 绝大部分孔纹没有中央小孔。除了孔纹结构之外, 靓纹拟菱形藻的壳面纵轴较窄, 在 1.4—1.8 μm 之间, 曼氏拟菱形藻壳面纵轴为 1.7—2.3 μm 。伪柔弱拟菱形藻孔纹的内部结构与前两者有明显区别, 它被一条横向的硅质“桥”分隔成两个略呈半圆形的小孔, 上下对称排列。花形拟菱形藻和尖细拟菱形藻的壳面为披针形, 区别特征也体现在孔纹的内部结构上: 花形拟菱形藻孔纹的内部被分隔成 4—7 个小孔, 分布在孔纹的四周, 孔纹中部为无纹区; 尖细拟菱形藻的孔纹结构与伪柔弱拟菱形藻类似, 被一条横向的硅质“桥”分隔成两个略呈半圆形的小孔, 上下对称排列。中华拟菱形藻的壳面孔纹特征变化大, 其内部有时没有小孔, 有时分成 2—3 个小孔, 且本种的壳面纵轴的宽度最大, 可达 4 μm 以上, 变化范围是 3.7—4.2 μm 。

3.3 壳面孔纹内部特征的稳定性及其在分类学中的应用

只有在电子显微镜下, 才能够区分伪柔弱拟菱形藻复合群的种类, 它们的区别特征主要是壳面外形、孔纹内部的小孔数量和排列方式, 尤其是孔纹内部小孔的结构特征是区分伪柔弱拟菱形藻复合群种类的关键性指标。然而, 在以往的形态分类学研究中, 曾报道有些硅藻种类如菱形藻属种类, 其壳面孔纹的形状在生活史的不同时期会有所变化^[27]。伪柔弱拟菱形藻复合群种类的主要区别特征是壳面孔纹内部小孔的排列方式, 也曾有学者怀疑孔纹的有些变化类型只是某一种类不同生活史阶段的特征, 于是引入 DNA 分子标记、序列比对等分子生物学技术验证了形态学结论, 认为伪柔弱拟菱形藻复合群种类之间孔纹的变化类型可以作为稳定的形态学特征^[7, 13]。然而, 拟菱形藻种类的形态学特征在生活史中会产生一些变化, 如壳端变成钝圆形等, 尤其是在有性生殖阶段, 变化更为明显^[7]。因此, 哪些形态学特征是稳定的, 可以作为不同种类之间的区别特征? 而哪些形态学特征只是同一种类在不同生活周期的变化? 需要在进一步的工作中加以研究和界定。

伪柔弱拟菱形藻复合群中, 靓纹拟菱形藻和曼氏拟菱形藻的形态学特征最为接近; Amato & Montresor 比较研究了伪柔弱拟菱形藻复合群种类的 ITS 序列, 认为曼氏拟菱形藻与靓纹拟菱形藻的遗传学亲缘关系最为接近^[7]。对比两者的 ITS (ITS1-5.8S-ITS2) 的碱基序列^[23], 发现两者在 ITS1 上的碱基差别为 10 个, 有三处插入(共 16 个碱基)和一处缺失(7 个碱基); 在 ITS2 上的碱基差别为 17 个, 有三处插入(共 12 个碱基); 5.8S 序列则没有差别。两者在形态学特征上的区别点如表 1 中所示, 靓纹拟菱形藻和曼氏拟菱形藻在形态学特征上的区别主要体现在: 壳面上具有中央小孔的孔纹比例、壳面纵轴大小、壳环带高度。且两者在后两个形态学特征上均有相互重叠的情况。因此, 孔纹内部是否具有中央小孔这一特征成为区分两者的重要依据, 而中央小孔的出现是种类的稳定特征, 还是不同生活史阶段的特征, 或是受到其他环境因子的影响而产生的特征, 目前尚不能确定。介于两者的形态学特征和遗传特征均表现出极大的相似性, 我们对 Amato & Montresor 于 2008 年新报道的曼氏拟菱形藻持保留观点。或许曼氏拟菱形藻与靓纹拟菱形藻是同一种类, 其孔纹的差异只是不同生活史阶段的变化。本文提供的靓纹拟菱形藻 TEM 照片(图版 1-11, 12)中, 虽然大部分孔纹内部都具有一个中央小孔, 但与中央船骨点对应的几列孔纹略有不同, 没有中央小孔, 且小孔的排列方式与曼氏拟菱形藻相似。因此, 孔纹内部小孔的数目及其排列方式是否能够作为种类区别的 stable 特征, 或者何种类型的孔纹特征是稳定的特征, 这也需要在后续的工作中加以明确。

参考文献:

- [1] Bates S S, Bird C J, Freitas D E. Pennate diatom, *Nitzschia pungens*, as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada [J]. *Canadian Journal Fishery Aquiculture Science*, 1989, **46**: 1203—1215
- [2] Bates S S, Garrison D L & Homer R A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species [A]. In Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M (Eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms* [M]. Heidelberg: Springer-Verlag. 1998, 267—292
- [3] Hallegraeff G M. Species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Australian waters [J]. *Botanica Marina*, 1994, **37**: 397—411

- [4] Chen J F, Xu N, Wang Z H, *et al.* Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and environmental factors in Daya Bay, the South China Sea [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(6): 743—748 [陈菊芳, 徐宁, 王朝辉, 等. 大亚湾拟菱形藻种群的季节变化与环境因子的关系. 环境科学学报, 2002, 22(6): 743—748]
- [5] Gao Y, Liang J R, Gao Y H, *et al.* Review of morphological and molecular identification of *Pseudo-nitzschia*, a bloom forming diatom [J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(1): 67—72 [高杨, 梁君荣, 高亚辉, 等. 赤潮拟菱形藻形态学分类和分子生物技术鉴定研究概述. 海洋科学, 2005, 29(1): 67—72]
- [6] Hasle G R. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30: 1036—1039
- [7] Amato A & Montresor M. Morphological, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex [J]. *Phycologia*, 2008, 47(5): 487—497
- [8] Qi Y Z, Wang J, Zheng L. The taxonomy and bloom ecology of *Pseudo-nitzschia* on the coasts of China [A]. In Proceedings IOC-WESRPAC Third International Scientific Symposium [M]. Bali: Indonesia Institute of Sciences. 1994, 88—95
- [9] Chen J F, Qi Y Z, Xu N, *et al.* *Pseudo-nitzschia* bloom and its ecological role in the biological community in the Daya Bay, the South China Sea [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(1): 114—119 [陈菊芳, 齐雨藻, 徐宁, 等. 大亚湾拟菱形藻水华及其在生物群落中的生态地位. 海洋学报, 2005, 27(1): 114—119]
- [10] Chen J F, Qi Y Z, Xu N, *et al.* Annual dynamics of phytoplankton community and abundance at Aotou Cover, Daya Bay [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(3): 311—317 [陈菊芳, 齐雨藻, 徐宁, 等. 大亚湾汕头水域浮游植物群落结构及周年数量动态. 水生生物学报, 2006, 30(3): 311—317]
- [11] Gao Y H, Yu Q B, Qi Y Z, *et al.* Species composition and ecological distribution of planktonic diatoms in the Changjiang River estuary during Spring [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(7): 1044—1048 [高亚辉, 虞秋波, 齐雨藻, 等. 长江口附近海域春季浮游硅藻的种类组成和生态分布. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1044—1048]
- [12] Gao Y H, Xie W L, Li Y, *et al.* *Pseudo-nitzschia*: taxonomy and biogeographical distribution in the estuary of Changjiang River, China [A]. In Witkowski A. (Eds.), Proceedings of 18th International Diatom Symposium [M]. Bristol: Biopress Limited. 2006, 75—90
- [13] Lundholm N, Moestrop Ø, Hasle G R, *et al.* A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidate* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima* [J]? *Journal of Phycology*, 2003, 39: 797—813
- [14] Martin J L, Haya K, Burridge L E, *et al.* *Nitzschia pseudodelicatissima*—a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada [J]. *Marine Ecological Progress Series*, 1990, 67: 177—182
- [15] Lundholm N, Skov J, Pocklington R, *et al.* Studies of the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia* 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters [J]. *Phycologia*, 1997, 36: 381—388
- [16] Lundholm N, Skov J, Pocklington R, *et al.* Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe [J]. *Phycologia*, 1994, 33: 475—478
- [17] Skov J, Lundholm N, Moestrop Ø, *et al.* Potentially toxic phytoplankton 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae) [A]. In Lindley J A (Eds.), ICES identification leaflets for plankton ICES [M]. Copenhagen: Palaegade 2-4, DK-1261. 1999, 1—23
- [18] Burić Z, Viličić D, Mihalić K C, *et al.* *Pseudo-nitzschia* blooms in the Zrmanja River Estuary (Estuary Adriatic Sea) [J]. *Diatom Research*, 2008, 23(1): 51—63
- [19] Hasle G R, Lange C B, Syvertsen E E. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic and adjacent waters [J]. *Helgol Meeresunters*, 1996, 50: 131—175
- [20] Xing X L, Yang J X, Kang Y Y, *et al.* Morphological study and toxic analysis for two *Pseudo-nitzschia* species isolated from Daya Bay [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2007, 26(4): 576—582 [邢小丽, 杨军霞, 康燕玉, 等. 大亚湾水域两种拟菱形藻的形态学鉴定及毒素分析. 台湾海峡, 2007, 26(4): 576—582]
- [21] Mann D G, McDonald S M, Bayer M M, *et al.* The *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species [J]. *Phycologia*, 2004, 43: 459—482
- [22] Sarno D, Kooistra W H C F, Medlin L K, *et al.* Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae) II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species, with the description of four new species [J]. *Journal of Phycology*, 2005, 41: 151—176
- [23] Amato A, Kooistra W H C F, Levialdi G J H, *et al.* Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms [J]. *Protist*, 2007, 158: 193—207
- [24] Beszteri B, John U, Medlin L K. An assessment of cryptic genetic diversity within the *Cyclotella meneghiniana* species complex (Bacillariophyta) based on nuclear and plastid genes, and amplified fragment length polymorphisms [J]. *European Journal of Phycology*, 2007, 42: 47—60
- [25] Vanormelingen P, Chepurinov V A, Mann D G, *et al.* Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris sensu lato* (Bacillariophyta) [J]. *Protist*, 2008, 159: 73—90

- [26] Mann D G, Evans K M. Molecular genetics and the neglected art of diatomics [A]. In Brodie J & Lewis J M (Eds), Unravelling the algae- the past, present and future of algal molecular systematics [M]. London: CRC Press. 2007, 231—265
- [27] Kaczmarska I, Fryxell G.A. The diatom genus *Nitzschia*: morphologic variation of some small bicapitata species in two Gulf Stream Warm Core Rings [A]. In Ricard M (Eds.), Proceeding of the eighth international diatom symposium [M]. Koenigstein: Otto Koeltz Science Publishers. 1986, 237—252

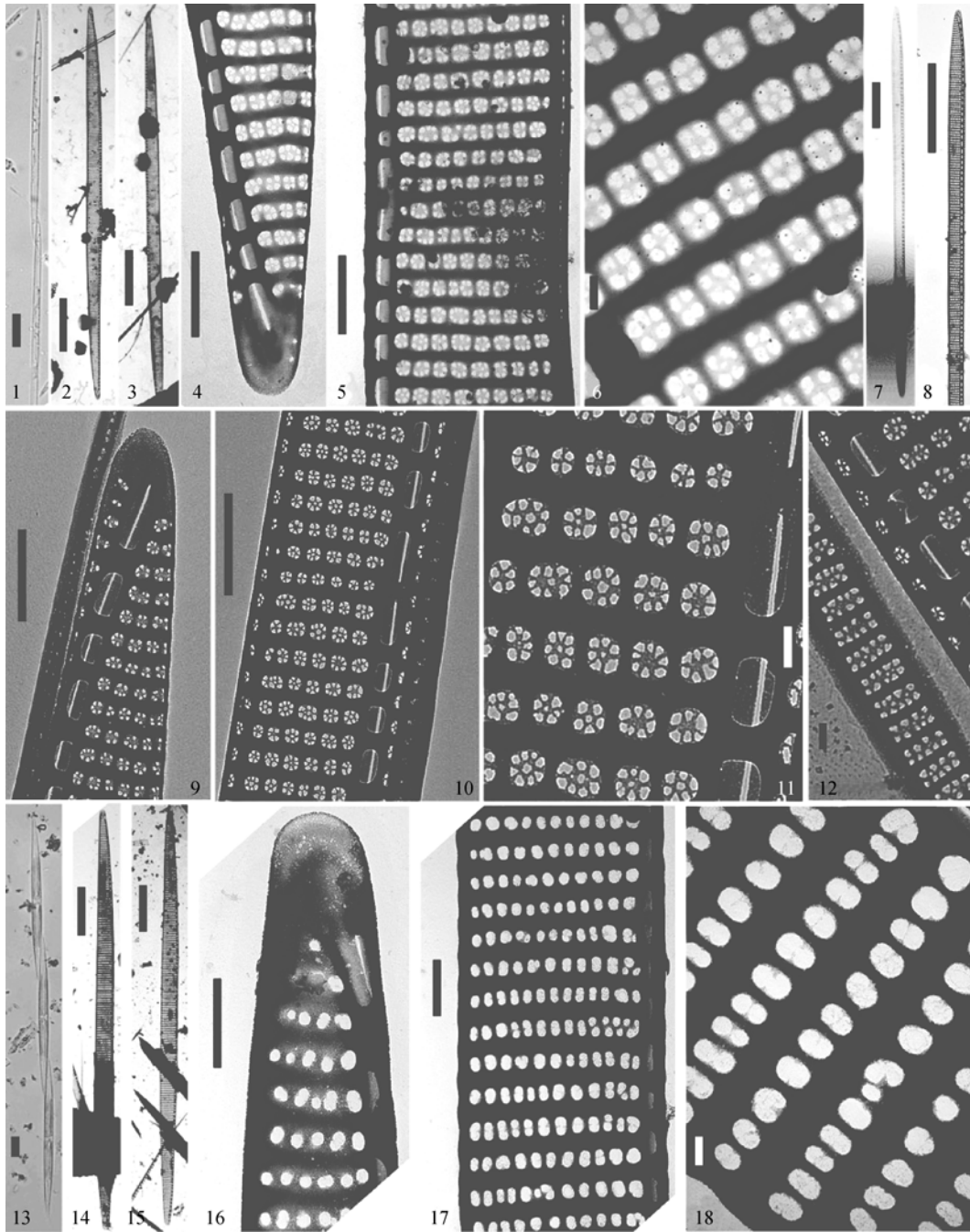
THE STUDY ON MORPHOLOGICAL TAXONOMY OF *PSEUDO-NITZSCHIA* *PSEUDODELICATISSIMA* COMPLEX

LI Yang¹, HE Li-Na¹, MA Yan-Yan¹ and LÜ Song-Hui^{1,2}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Healthy and Safe Aquaculture, Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Institute of Harmful Algae and Aquatic Environment, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Increasing evidence show that cryptic and pseudo-cryptic species are widespread in several diatom taxa. This is the case with the genus *Pseudo-nitzschia*, which includes chain-forming pennate diatoms that bloom both in coastal and open ocean waters. In the last years, up 10 new species have been described on the basis of morphological and molecular investigations, and some of them are only distinguishable on the basis of minute ultrastructural features of their siliceous frustulae. This is the case of *P. pseudodelicatissima* complex. It has been confirmed that *P. pseudodelicatissima* complex was a kind of pelagic diatom species which distribute commonly in Chinese coastal waters. Because of few subtle morphological features which just could be observed under electronic microscope (EM) among *P. pseudodelicatissima* complex taxa, it is greatly difficult to reach accurate identification and there are many debates at present. For clarifying the species diversity of *P. pseudodelicatissima* complex and its dominant species in Daya Bay, water and net samples were collected from six stations in summer (August), 2007. All samples were fixed with Lugo's solution in situ and brought back to the laboratory. Then, they were concentrated to a final volume about 2—10 mL by settlement overnight for several times. These samples could be observed and analyzed under light microscope. For observation under transmission electron microscope, subsamples were taken and treated through several steps. Firstly, after dropped into same volume of concentrated H₂SO₄, these samples were boiled in the water bath for about 15—20 minutes to remove the organic materials. Secondly, these samples should be washed to neutrality with distilled water for several times. Then, these samples could be observed, identified, photographed and counted under transmission electron microscope. Including six species, *P. caciaantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, *P. calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, *P. cuspidata* (Hasle) Lundholm, Moestrup & Hasle, *P. mannii* Amato & Montresor, *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Lundholm, Hasle & Moestrup and *P. sinica* Qi & Wang, *P. pseudodelicatissima* complex were found. And *P. caciaantha*, *P. calliantha*, *P. mannii* were identified as three newly recorded diatom species for China. Along with LM and TEM photos, the detailed morphological description, habits and ecological distribution of these six species were given in this paper. Simultaneously, the taxonomic comparison among resembling species were made. The six species described in this paper have morphological features in common: the long and slender valves, the present of a larger central interspace, the uniseriate striae, the similarity of the structure of the valve face and the valve mantle, and the hexagonal perforation pattern of the poroid hymen. However, several other features such as structure of the poroid hymen, density of fibulae and striae, the width and shape of valves, and the structure of the cingular bands differed among the species and could be used for differentiating these six species from each other. After investigation of the cell abundance of each species, it is concluded that the most common species distributing in Daya Bay is *P. calliantha*, not *P. pseudodelicatissima* which has been reported formerly.

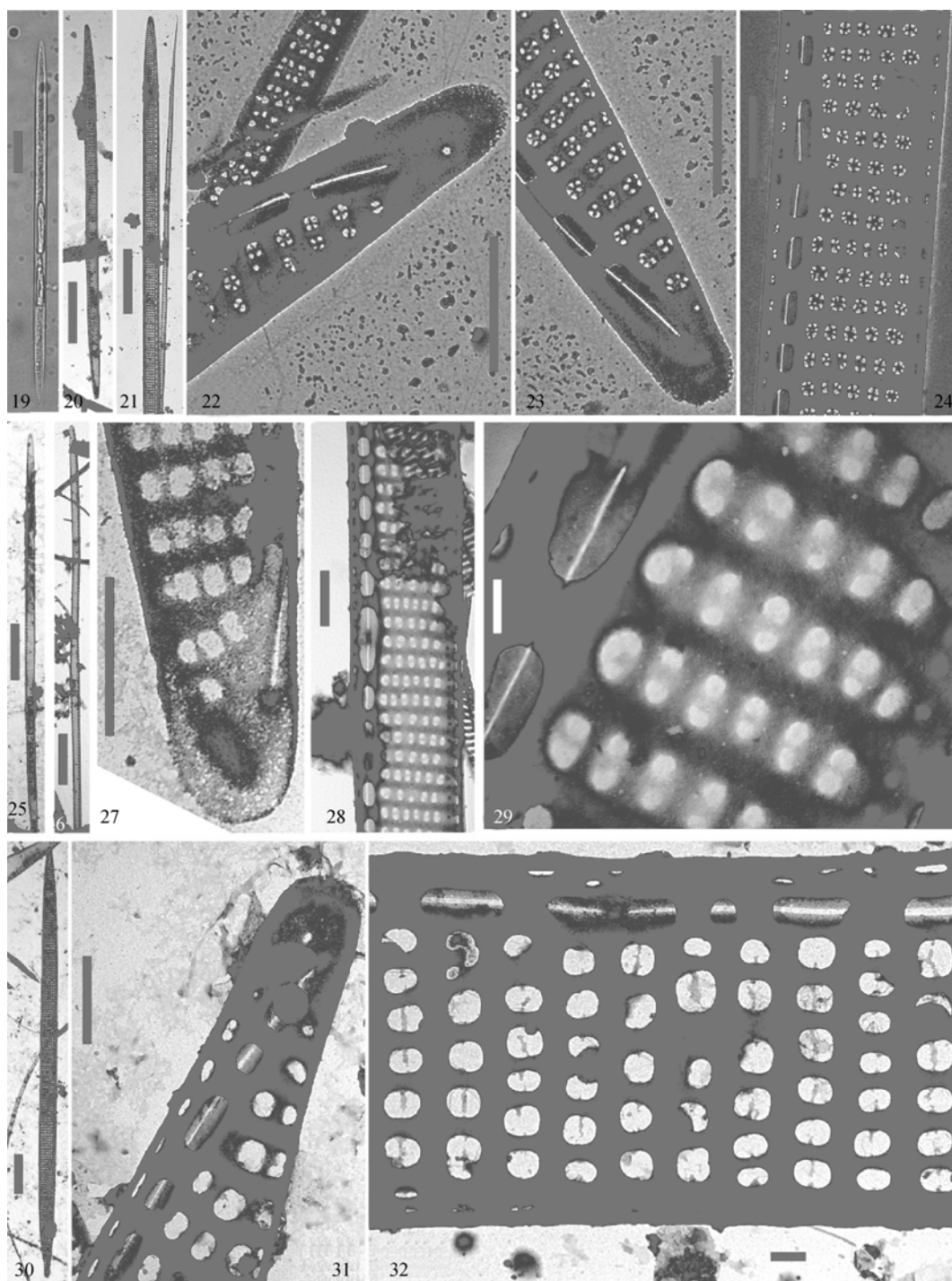
Key words: *P. pseudodelicatissima* complex; Morphological characteristics; New records; Daya Bay



图版 I Plate I

1—6. 花形拟菱形藻; 1. 示链状群体; 2, 3. 示完整壳面; 4. 示壳端; 5. 示壳面中部及中央船骨点; 6. 示孔纹内部小孔排列方式。7—12 靓纹拟菱形藻; 7, 8. 示完整壳面; 9. 示壳端; 10. 示壳面中部及中央船骨点; 11. 示孔纹内部小孔排列方式, 多数具有中央小孔; 12. 示壳环带。13—18 尖细拟菱形藻; 13. 示群体; 14, 15. 示完整壳面; 16. 示壳端; 17. 示壳面中部及中央船骨点; 18. 示孔纹内部两个小孔的排列。图 1, 13 为 LM 照片; 其余均为 TEM 照片。1—3、7、8、13—15 的比例尺为 10 μm ; 图 4、5、9、10、16、17 的比例尺为 1 μm ; 图 6、11、12、18 的比例尺为 200 nm

1—6. *P. caciontha*; 1. Stepped-shape colony; 2, 3. Whole valve views; 4. Valve end; 5. Middle part of valve showing larger central nodule; 6. Pattern of sectors in poroids and many poroids do not have a central sector; 7—12. *P. calliantha*; 7, 8. Whole valve views; 9. Tip of valve; 10. Middle part of valve showing larger central nodule; 11. Pattern of sectors in poroids and many poroids have a central sector; 12. Advalvar circular band; 13—18. *P. cuspidata*; 13. Overlapping cells in colony; 14, 15. Whole valves; 16. Valve end; 17. Central part of valve and a central nodule; 18. Each poroid divided into two parts; 1, 13 were photographed under LM and else figures under TEM. Scale bars are 10 μm in 1—3, 7, 8, 13—15 and 1 μm in 4, 5, 9, 10, 16—17 and 200 nm in 6, 11, 12, 18



图版 II Plate II

19—24 曼氏拟菱形藻; 19—21. 示完整壳面; 22—23. 示壳端及壳环带; 24. 示壳面中部, 包括中央船骨点、多数孔纹没有中央小孔。25—29 伪柔弱拟菱形藻; 25—26. 示完整壳面; 27. 示壳端; 28. 示壳面中部和中央船骨点; 29. 示孔纹内部小孔的排列方式。30—32 中华拟菱形藻; 30. 示完整壳面; 31. 示壳端; 32. 示壳面中部, 包括中央船骨点和孔纹内部结构。19 为 LM 照片; 其余均为 TEM 照片; 19—21、25、26、30 的比例尺为 10 μm ; 22—24、27、28、31 的比例尺为 1 μm ; 29、32 的比例尺为 200 nm

19—24. *P. mannii*; 19—21. Whole valve views; 22—23. Valve ends and advalvar circular band; 24. Middle part of valve including a larger central nodule and just few poroids have a central sectors; 25—29. *P. pseudodelicatissima*; 25—26. Whole valves; 27. Tip of valve; 28. Central part of valve and a larger central nodule; 29. Each poroid divided into two parts. 30—32. *P. sinica*; 30. Whole valve; 31. Valve end; 32. Middle part of valve including a larger central nodule and every poroid divided into two parts. All Figs were photographed under TEM except 19 under LM. Scale bars are 10 μm in 19—21, 25, 26, 30 and 1 μm in 22—24, 27, 28, 31 and 200 nm in 29, 32